

*Załącznik nr 3  
do Wniosku z dnia 25.03.2019r.  
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego*

## **Autoreferat**

**Małgorzata Reda**

Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Uniwersytet Wrocławski

Wrocław 2019 r.

1. Imię i Nazwisko:

Małgorzata Reda (nazwisko panieńskie: Konieczna)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

**1996** – magister biologii w zakresie biologii środowiskowej, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych), Uniwersytet Wrocławski, praca pod tytułem: „Rola enzymów proteolitycznych w procesach funkcjonowania reduktazy azotanowej” zrealizowana pod kierunkiem dr Jolanty Jerzykiewicz w Zakładzie Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki

**2001** – doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność fizjologia roślin, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych), Uniwersytet Wrocławski, tytuł rozprawy doktorskiej: „Potranslacyjna regulacja korzeniowej reduktazy azotanowej przez czynniki środowiskowe”, praca zrealizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Kłobus w Zakładzie Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

**2002 – 2003** – asystent w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

**2003** – do chwili obecnej – adiunkt w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Roślin (obecnie Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej), Uniwersytet Wrocławski

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.2016r. poz.882 ze zm. W Dz. U. z 2016r. poz. 1311.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

**Molekularna regulacja reduktazy azotanowej i jej udział w odpowiedzi roślin na stres**

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Impact Factor (IF) zgodny z rokiem opublikowania, punkty MNiSW wg listy z dn. 26 stycznia 2017r.

1. Reda M, Migocka M, Kłobus G, 2011 Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots. Plant Science 180: 783-788 [IF<sub>2011</sub>: 3.99, MNiSW: 35pkt], udział własny 70%

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji, zaplanowanie układu eksperymentalnego, wykonanie doświadczeń, współudział w identyfikacji genów kodujących reduktazę azotanową u ogórka i oznaczeniu ich ekspresji, interpretację i*

*dyskusję wyników oraz napisanie manuskryptu. Jestem zarówno pierwszym autorem, jak i autorem korespondencyjnym. Udział procentowy oceniam na 70%.*

2. Reda M, 2013 Regulation of nitrate reduction in *Arabidopsis* WT and *hxx1* mutant under C and N metabolites. *Physiologia Plantarum* 149: 260-272 [IF<sub>2013</sub>: 3.262, MNiSW: 40pkt], udział własny 100%

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje opracowanie koncepcji, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń oraz napisanie manuskryptu.*

3. Reda M, 2015 Response of nitrate reductase activity and *NIA* genes expression in roots of *Arabidopsis hxx1* mutant treated with selected carbon and nitrogen metabolites. *Plant Science* 230: 51-58 [IF<sub>2015</sub>: 3.362, MNiSW: 35pkt], udział własny 100%

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje opracowanie koncepcji, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń oraz napisanie manuskryptu.*

4. Reda M, Golicka A, Kabała K, Janicka M, 2018 Involvement of NR and PM-NR in NO biosynthesis in cucumber plants subjected to salt stress. *Plant Science* 267: 55-64 [IF<sub>2017-2018</sub>: 3.712, MNiSW: 35pkt], udział własny 70%

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji projektu i zaplanowaniu układu eksperymentalnego, wykonanie części doświadczeń (oznaczenie parametrów wzrostowych, poziomu NO w korzeniach w obecności inhibitorów metodą fluorescencyjną, analizy HPLC, Western blot), opracowanie, interpretację oraz dyskusję wszystkich wyników i napisanie manuskryptu. Jestem zarówno pierwszym autorem tej pracy, jak i autorem korespondencyjnym. Udział procentowy oceniam na 70%*

Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych publikacji wynosi: **14,326**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW wyżej wymienionych publikacji (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 26 stycznia 2017r) wynosi: **145**

### c) omówienie osiągnięcia naukowego

Azot, obok węgla, wodoru i tlenu, jest jednym z podstawowych pierwiastków budujących związki organiczne w organizmach żywych. Włączanie nieorganicznego azotu w związki organiczne, czyli jego asymilacja, przeprowadzana jest przez rośliny, które pobierają azot mineralny z roztworu glebowego w postaci jonów azotanowych ( $\text{NO}_3^-$ ) i amonowych ( $\text{NH}_4^+$ ). Oba te jony są równorzędnymi formami nieorganicznego azotu dla roślin, jednak ze względu na warunki panujące w naszych glebach uprawnych oraz uwarunkowania metaboliczne, dla większości roślin głównym źródłem N nieorganicznego są azotany. Po pobraniu przez rośliny podlegają one redukcji do jonów amonowych i dopiero w takiej postaci azot jest włączany w strukturę  $\alpha$ -ketokwasów stanowiących organiczne szkielety węglowe, w wyniku czego powstają aminokwasy. Asymilacja azotanów przez rośliny wyższe obejmuje dwustopniową redukcję jonów  $\text{NO}_3^-$  do  $\text{NH}_4^+$ . Enzymem

inicjującym ten proces jest reduktaza azotanowa (NR) (Campbell 2001). Białko to katalizuje redukcję  $\text{NO}_3^-$  do  $\text{NO}_2^-$ , która odbywa się przez przeniesienie dwóch elektronów z donora jakim jest (NAD(P)H) na akceptor, czyli jon azotanowy (Meyer i Stitt 2001). Powstający w tej reakcji azotyn jest toksyczny i szybko ulega dalszej redukcji w chloroplastach lub plastydach do jonów amonowych w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotynową (NiR). Z kolei wytworzone amony są włączane w strukturę szkieletów węglowych 2-oxoglutaranu w cyklu GS-GOGAT (syntetazy glutaminowej - syntazy glutaminianowej) (Masclaux-Daubresse i wsp. 2010, Krapp 2015). Procesy asymilacji azotanów ze względu na wysokie zapotrzebowanie na szkielety węglowe i energię zlokalizowane są głównie w tkankach zielonych. Aby zapobiec wyczerpaniu roślinnych zasobów węglowodanów i uniknąć akumulacji toksycznych dla rośliny produktów pośrednich (jonów  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NH}_4^+$ ), poszczególne etapy asymilacji azotu, a zwłaszcza jej pierwszy etap, czyli redukcja azotanów, podlegają ścisłej kontroli, a reduktaza azotanowa uważana jest za enzym kluczowy, decydujący i limitujący przyswajanie nieorganicznego azotu przez rośliny (Campbell 2001).

Reduktaza azotanowa zlokalizowana jest w cytoplazmie i funkcjonuje jako homodimer, a każda podjednostka składa się z trzech grup prostetycznych: kofaktora flawinoadeninowego (FAD) zlokalizowanego na C-końcu białka, kofaktora hemowego b557 ( $\text{cyt}_{b557}$ ) oraz kofaktora molibdenowego (molibdenopteryny, MoCo) na N-końcu białka. Między poszczególnymi kofaktorami znajdują się tzw. regiony zawiasowe: H1 między domeną molibdenową a hemową i H2 między domeną hemową a FAD. Regiony te są niezwykle istotne dla utrzymania prawidłowej struktury dimeru (region H2) oraz dla regulacji aktywności katalitycznej NR (region H1). Ponadto wyróżnia się również N-końcowy fragment bogaty w aminokwasy o charakterze kwasowym ważny w regulacji aktywności NR oraz fragment na C-końcu odpowiedzialny za interakcje enzymu z donorem elektronów (Campbell 2001, Chamizo-Ampudia i wsp. 2017).

Wiadomo, że kontrola aktywności katalitycznej reduktazy azotanowej zachodzi zarówno na poziomie genetycznym, obejmującym regulację ekspresji genów kodujących NR oraz na poziomie potranslacyjnym, obejmującym modyfikacje białka enzymatycznego. Reduktaza azotanowa jest enzymem indukcyjnym, a głównym i pierwotnym czynnikiem indukującym ekspresję genów kodujących NR są azotany, będące jednocześnie substratem dla tego enzymu (Crawford i Arst 1993). Białko NR u znakomitej większości roślin kodowane jest przez dwa geny strukturalne, które u rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* nazwano genami *NIA1* i *NIA2*. Szczegółowe badania z wykorzystaniem mutantów poszczególnych genów *NIA* wykazały, że białkowy produkt genu *NIA2* odpowiada za około 90% aktywności reduktazy azotanowej. Za pozostałe 10% odpowiada białko kodowane przez gen *NIA1* (Wilkinson i Crawford 1993). Wykazano, że indukcja ekspresji genów *NIA* u *Arabidopsis thaliana* pod wpływem azotanów jest bardzo szybka i już po 30 minutowym

traktowaniu w tkankach roślinnych wzrasta wielokrotnie ilość specyficznego transkryptu NR-mRNA (Wang i wsp. 2000 i 2003). Dodatkowo w promotorach genów *NIA* zidentyfikowano i scharakteryzowano specyficzną sekwencję *cis*-regulatorową odpowiadającą za wrażliwość na azotany (Lin i wsp. 1994, Hwang i wsp. 1997). Indukcja ekspresji genów kodujących NR przez azotany jest możliwa tylko na świetle (Hoff i wsp. 1992). Co więcej zaobserwowano, że obecność w środowisku produktów fazy ciemnej fotosyntezy np. glukozy lub sacharozy, może zastępować światło podczas indukcji ekspresji genów NR (Cheng i wsp. 1992). Dowodzi to ścisłego powiązania metabolizmu azotu z metabolizmem węgla. Sugeruje także, że działanie światła na ekspresję genów NR jest raczej pośrednie i odbywa się poprzez produkty fotosyntezy. Wiele procesów biochemicznych charakteryzuje tak zwane sprzężenie zwrotne, w którym nadmiar produktów reakcji powoduje ograniczenie ich syntezy, najczęściej poprzez zahamowanie aktywności biologicznej enzymów biorących udział w reakcji. Podobnie jest w przypadku asymilacji azotu, gdzie końcowe produkty asymilacji takie jak glutamina, glutaminian czy asparaginian ograniczają poszczególne etapy tego procesu, w tym redukcję azotanów (Miller i wsp. 2007). Może się to odbywać dzięki obniżeniu ekspresji genów kodujących NR, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy *de novo* białka lub poprzez modyfikacje istniejącego już białka enzymatycznego, prowadzące do zahamowania jego aktywności katalitycznej.

O poziomie aktywności reduktazy azotanowej w tkankach, oprócz intensywności ekspresji genów *NIA*, decydują także posttranslacyjne modyfikacje białka enzymatycznego. Zmiany te, w odróżnieniu od regulacji na poziomie genetycznym, są bardzo szybkie i co ważne odwracalne. Dzięki temu roślina może szybko reagować na zmiany warunków zewnętrznych i dostosować intensywność asymilacji azotu. W tkankach zielonych takie szybkie modulacje aktywności NR zaobserwowano w odpowiedzi na zmiany warunków świetlnych środowiska, czy poziomu dwutlenku węgla (de Cires i wsp. 1993). Obserwowano spadek aktywności NR w liściach już 20 min po przeniesieniu roślin do ciemności. Reaktywacja następowała równie szybko na świetle (Huber i wsp. 1992, Lillo 1994). Te modyfikacje aktywności NR związane są z odwracalną fosforylacją białka enzymatycznego (Kaiser i Huber 1994). Wczesne badania prowadzone głównie na tkankach zielonych pokazały, że NR może występować w trzech stanach: nieufosforylowanym (dpNR), ufosforylowanym (pNR) i jako kompleks pNR z białkiem 14-3-3. Nieufosforylowana NR jest formą aktywną w tkankach. Fosforylacja regulatorowej reszty seryny zlokalizowanej w regionie H1 zmienia stan aktywacji enzymu, jednak enzym jest nadal zdolny do redukcji  $\text{NO}_3^-$ , do momentu przyłączenia białka 14-3-3. Białko to rozpoznaje ufosforylowany motyw serynowy NR, a warunkiem asocjacji jest obecność kationów dwuwartościowych (np.  $\text{Mg}^{2+}$ ) lub poliamin (Kaiser i Huber 2001). Powstaje wówczas nieaktywny kompleks pNR-14-3-3, który zachowuje powinowactwo do substratu, ale traci zdolność transportu elektronów z NAD(P)H na  $\text{NO}_3^-$  (Kaiser i

wsp 2002, Lillo i wsp. 2004). Dysocjacja kationów dwuwartościowych i/lub defosforylacja NR prowadzi do dysocjacji białka 14-3-3 z nieaktywnego kompleksu. W efekcie enzym przechodzi odpowiednio w stan pNR lub dpNR odzyskując aktywność katalityczną. W warunkach *in vitro* po raz pierwszy zależności te zaobserwowali Kaiser i Huber (1997) i wykorzystali w badaniach nad mechanizmami regulacji aktywności NR w różnych warunkach środowiskowych. I tak, w obecności kationów  $Mg^{2+}$  oznaczali aktywność jedynie formy nieufosforylowanej (dpNR) i określili ją jako aktywność aktualną. Usuwając  $Mg^{2+}$  z mieszaniny reakcyjnej poprzez chelatowanie z EDTA, oznaczali aktywność zarówno formy dpNR jak i pNR (ufosforylowanej) i określili ją jako aktywność całkowitą. Stosunek aktywności aktualnej do całkowitej pozwala na wyznaczenie stopnia aktywacji reduktazy azotanowej w określonych warunkach środowiskowych (Kaiser i Huber 1997). Podobny schemat oznaczania aktywności wykorzystałam także w swoich badaniach prowadzonych w ramach doktoratu, jak i podczas późniejszych badań, które złożyły się na osiągnięcie naukowe prezentowanej rozprawy habilitacyjnej.

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe zatytułowane „Molekularna regulacja reduktazy azotanowej i jej udział w odpowiedzi roślin na stres” obejmuje cztery prace oryginalne, w których skupiłam się na: 1) wyjaśnieniu molekularnych podstaw regulacji NR przez produkty metabolizmu węgla i azotu, 2) regulacji aktywności NR w warunkach stresu solnego, a także 3) określeniu roli NR w generowaniu tlenu azotu w odpowiedzi roślin na zasolenie.

Z uwagi na fakt, że pełna asymilacja azotu przez rośliny wymaga dostępu łańcuchów węglowych, istnieje ścisła korelacja procesów metabolizmu azotanów z metabolizmem węglowym. Zapewnia to utrzymanie właściwego stosunku C:N w tkankach i warunkuje sprawne włączanie nieorganicznego N w związki organiczne. Na tym tle niezwykle ważne wydaje się poznanie podstaw molekularnego podłoża precyzyjnej regulacji reduktazy azotanowej przez produkty pośrednie zarówno asymilacji węgla jak i azotu. Jak wcześniej wspomniano, szereg czynników środowiskowych reguluje aktywność katalityczną NR, zarówno poprzez modulacje ekspresji genów kodujących enzym jak i modyfikacje białka enzymatycznego. Endogenne, końcowe produkty asymilacji azotu, takie jak glutamina, czy kwas glutaminowy, hamują poszczególne etapy procesu ograniczając asymilację azotanów, podczas gdy produkty fotosyntezy i oddychania komórkowego (glukoza, sacharoza,  $\alpha$ -ketoglutaran) zwiększają ich intensywność. Jednakże molekularny mechanizm działania tych związków oraz transdukcja sygnału pozostają niejasne. Ze względu na różny stopień pobierania substancji przez rośliny i różną intensywność ich przemian w tkankach najlepszy model badawczy stanowią rośliny transgeniczne, charakteryzujące się defektami metabolicznymi warunkującymi obniżony endogenny poziom określonych substancji oraz uszkodzenia szlaków metabolicznych. Dlatego badania nad regulacją aktywności NR przez

produkty metabolizmu węgla i azotu przeprowadziłam na mutantach *hxx1 Arabidopsis thaliana* z uszkodzonym genem kodującym heksokinazę 1 (HXK1). Ponieważ heksokinaza pełni w komórkach podwójną rolę, kinazy fosforylującej heksozy, ale też receptora glukozy, mutant ten charakteryzuje się także zaburzeniami w transdukcji sygnału glukozowego (Sheen i wsp. 1999, Moore i wsp. 2003). Na badania uzyskałam finansowanie w ramach projektu badawczego nr N N303 321137 (2009-2012), którego byłam kierownikiem, a ich efektem są dwie prace osiągnięcia habilitacyjnego. Pierwsza praca zatytułowana "Regulation of nitrate reduction in *Arabidopsis* WT and *hxx1* mutant under C and N metabolites" (Reda 2013 *Physiologia Plantarum* 149: 260-272) dotyczy regulacji NR przez metabolity węglowe i azotowe w tkankach zielonych *Arabidopsis*. Druga praca to "Response of nitrate reductase activity and *NIA* genes expression in roots of *Arabidopsis hxx1* mutant treated with selected carbon and nitrogen metabolites" (Reda 2015 *Plant Science* 230: 51-58) opisująca regulację NR w korzeniach rzodkiewnika.

Badania prowadziłam na 6 tygodniowych roślinach typu dzikiego i mutantu *hxx1*. Zaobserwowałam, że rośliny homozygotycznego mutantu *hxx1* były o połowę mniejsze niż rośliny typu dzikiego i charakteryzowały się o połowę niższą niż w typie dzikim aktywnością heksokinazową. Pomimo obniżonej aktywności heksokinazowej poziom endogennych fosforanów cukrów w liściach, zarówno G-6-P i F-6-P, nie odbiegał znacząco od ilości oznaczonej w liściach WT. Mogło to wynikać z faktu, że u *Arabidopsis* glukoza jest fosforylowana nie tylko przez heksokinazę 1, ale także przez pozostałe izoformy (HXK2 i HXK3), które jednak w przeciwieństwie do HXK1 nie pełnią funkcji receptorowej i nie są zaangażowane w transdukcję sygnału glukozowego (Karve i wsp. 2008). Ponadto w liściach fosforany heksoz mogą powstawać także w wyniku aktywności fotosyntetycznej (Granot 2008). Jak pokazałam w pierwszej pracy (Reda 2013, *Physiol Plant* 149: 260-272) egzogennie podawane cukry (glukoza i sacharoza) zwiększały aktualną aktywność reduktazy azotanowej, czyli aktywność formy nieufosforylowanej - dpNR w liściach *Arabidopsis*. Z kolei aktywność całkowita reduktazy azotanowej, czyli aktywność całej puli enzymu w tkance, zarówno formy nieufosforylowanej (dpNR) jak i ufosforylowanej (pNR), nie zmieniała się w liściach pod wpływem cukrów, mimo że obserwowano równocześnie wzrost ekspresji genów *NIA*. Podobne zmiany aktywności NR obserwowano w liściach roślin po egzogennym podaniu  $\alpha$ -ketoglutaranu. Wzrost aktywności aktualnej, czyli aktywności formy nieufosofrylowanej NR, w stosunku do aktywności całkowitej puli enzymu w tkance prowadził do zwiększenia tzw. stanu aktywacji NR. Oznacza to, że zwiększała się ilość formy nieufosforylowanej NR w stosunku do formy ufosforylowanej (pNR), co wynikało z defosforylacji białka enzymatycznego. Tak więc pokazałam, że za wzrost katalitycznej aktywności NR w liściach *Arabidopsis* w odpowiedzi na egzogennie podawane metabolity węgla, takie jak cukry i  $\alpha$ -

ketoglutaran, odpowiedzialne są głównie potranslacyjne modyfikacje białka enzymatycznego związane z jego defosforylacją. Opisane wyżej zmiany aktywności reduktazy azotanowej obserwowane były zarówno w liściach *Arabidopsis* typu dzikiego, jak i u mutantu *hxx1*, co dowodziło, że transdukcja bodźca cukrowego prowadząca do defosforylacji białka enzymatycznego NR i w konsekwencji do stymulacji aktywności w liściach *Arabidopsis* nie jest zależna od sygnalینگowej roli heksokinazy1 i nie odbywa się z udziałem tego receptora. Ponadto w pracy tej pokazałam, że egzogennie wprowadzone metabolity węgla stymulują pobieranie azotanów. Jony te są nie tylko substratem dla reduktazy azotanowej, ale także czynnikiem indukującym aktywność enzymu. Zwiększone pobieranie  $\text{NO}_3^-$  w obecności egzogennych metabolitów węgla może więc sprzyjać stymulacji aktywności NR w liściach roślin. Mutacja *hxx1* nie miała wpływu na ilość pobranych azotanów w obecności metabolitów C i proces zachodził z podobną intensywnością jak u roślin typu dzikiego. Tak więc, zmiany szybkości pobierania azotanów wywołane metabolitami C, podobnie jak ich redukcja przez NR nie angażują ścieżki sygnałowej inicjowanej sygnałami percepowanymi przez heksokinazę1.

Podobne badania przeprowadziłam na korzeniach mutantu *hxx1 Arabidopsis*, a ich wyniki opublikowałam w pracy "Response of nitrate reductase activity and *NIA* genes expression in roots of *Arabidopsis hxx1* mutant treated with selected carbon and nitrogen metabolites" (Reda 2015 Plant Science 230: 51-58). Wykazałam, że w korzeniach typu dzikiego, inaczej niż to obserwowano w liściach, egzogennie podawana sacharoza lub  $\alpha$ -ketoglutaran powodowały wzrost zarówno aktualnej jak i całkowitej aktywności NR. Ponadto, stosunek aktywności aktualnej, czyli dpNR do aktywności całkowitej, czyli sumy aktywności dpNR i pNR, zwiększał się, co oznaczało wzrost stanu aktywacji NR w korzeniach traktowanych sacharozą i  $\alpha$ -ketoglutaranem. Powyższe wyniki dowiodły, że stymulacja aktywności NR wywołana metabolitami C była wynikiem modyfikacji potranslacyjnych białka obejmujących jego defosforylację. W korzeniach *Arabidopsis* traktowanych metabolitami C, w odróżnieniu od liści, stymulacja aktywności całkowitej NR (dpNR i pNR) była skorelowana ze wzrostem ekspresji genów *NIA*. To pokazuje, że w korzeniach zmiany aktywności reduktazy azotanowej indukowane obecnością metabolitów C wynikają nie tylko z modyfikacji potranslacyjnych białka enzymatycznego, ale również obejmują poziom ekspresji genów kodujących NR. W korzeniach mutantu *hxx1*, w przeciwieństwie do liści, stymulujący efekt sacharozy i  $\alpha$ -ketoglutaranu na aktywność reduktazy azotanowej był znacznie słabszy. W korzeniach mutantu obserwowałam też zredukowaną aktywność heksokinazową i obniżony tkankowy poziom G6P i F6P. Wyniki te pokazują, że w przekazywaniu sygnału cukrowego oraz w generowaniu odpowiedzi NR na metabolity C w korzeniach istotne znaczenie ma odpowiedni



poziom fosforanów heksoz związany z aktywnością enzymatyczną heksokinazy, ale transdukcja sygnału nie zależy od sygnalingowej funkcji HXK1.

Kolejne dwie prace przedstawione w ramach osiągnięcia habilitacyjnego dotyczą zmian aktywności reduktazy azotanowej w odpowiedzi na zasolenie środowiska. Badania nad kompleksową odpowiedzią roślin uruchamianą w warunkach stresów abiotycznych stanowią jeden z głównych nurtów badawczych realizowanych od wielu lat w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin (ZFMR), a rośliną modelową w tych badaniach jest ogórek *Cucumis sativus* L. Dlatego kolejne badania wpisujące się w nurt prac prowadzonych w ZFMR prowadziłam na siewkach ogórka. Roślina ta stanowiła materiał badawczy także w moich wcześniejszych badaniach rozpoczętych jeszcze podczas doktoratu i dotyczących mechanizmu potranslacyjnych modyfikacji reduktazy azotanowej.

Wiadomo, że zasolenie jest czynnikiem modyfikującym wiele procesów fizjologicznych zachodzących w roślinach. Wcześniejsze doniesienia literaturowe pokazały, że nadmiar soli w środowisku wpływa na różne etapy asymilacji azotu, także na aktywność reduktazy azotanowej. Wykazano, że w zależności od czasu działania stresu solnego, jego natężenia oraz badanego organu i gatunku roślin, aktywność NR była obniżona (liście fasoli, kukurydzy, buraka cukrowego, pomidora) (Gouia i wsp. 1994, Abd el Baki i wsp. 2000, Ghoulam i wsp. 2002) lub podwyższona (korzenie pomidora i soi) (Bourgeais-Chaillou i wsp. 1992, Debouba i wsp. 2007). Sugerowano, że stres solny może modyfikować aktywność NR pośrednio, poprzez negatywny wpływ na pobieranie azotanów z podłoża (Flores i wsp. 2004). Jednak molekularne mechanizmy regulacji aktywności NR przez NaCl nie były do końca wyjaśnione. Dlatego zaplanowałam doświadczenia mające na celu sprawdzenie wpływu stresu solnego na transkrypcję genów reduktazy NR u ogórka oraz modyfikacje potranslacyjne tego enzymu. Do tej pory większość badań nad NR prowadzono na tkankach zielonych roślin wyższych, jednakże enzym ten wykazuje wysoki poziom aktywności także w korzeniach (Ruffy i wsp. 1986). Co więcej, korzeń jest bezpośrednio narażony na podwyższoną zawartość soli w środowisku, dlatego przeprowadzone badania dotyczyły NR w korzeniach. Wyniki badań wykonanych przeze mnie wcześniej pokazały, że aktywność NR w korzeniach ogórka może podlegać potranslacyjnym modyfikacjom w odpowiedzi na warunki środowiskowe, takie jak niedobór tlenu (Reda, Kłobus 2008). Teraz wykazano, że także krótkoterminowe (do 60 min) działanie NaCl w stężeniu 200 mM powoduje znaczny wzrost aktualnej aktywności NR (nieufosforylowanej NR) w korzeniach, który był niwelowany w obecności inhibitorów fosfataz: kantarydyny i mikrocystyny-LR. Ważną część badań stanowiło określenie poziomu ekspresji genów kodujących NR w korzeniach ogórków uprawianych w tych samych warunkach eksperymentalnych. U większości roślin wyższych, w tym u modelowego

*Arabidopsis thaliana*, NR kodowana jest przez dwa geny. Wykonana przez mnie analiza genomu ogórka wykazała natomiast obecność trzech sekwencji kodujących NR (*CsNR1*, *CsNR2* i *CsNR3*). Następnie zamplifikowałam i ustaliłam skład nukleotydowy sekwencji genów *CsNR* oraz zaprojektowałam specyficzne startery do badania poziomu transkryptów tych genów w różnych organach ogórka i w różnych warunkach uprawy roślin. Wykazałam, że wszystkie geny *CsNR* ulegały ekspresji w korzeniach ogórka, jednak poziom transkryptów dwóch z nich: *CsNR1* i *CsNR3* był znacznie obniżony na skutek krótkiego (60 min) działania 200 mM NaCl. Otrzymane przez mnie wyniki dowiodły, że krótkotrwałe działanie stresu solnego powoduje zmiany aktywności NR w korzeniach na dwóch poziomach regulacji: potranslacyjnym, poprzez stymulację aktywności enzymu na drodze odwracalnej defosforylacji zależnej od białkowych fosfataz oraz transkrypcyjnym, poprzez modulację ekspresji genów kodujących NR. Wyniki te zostały opublikowane w artykule oryginalnym zatytułowanym "Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots" (Reda i wsp. Plant Science 180: 783-788) stanowiącym część osiągnięcia naukowego.

Jak wcześniej wspomniałam, wyniki badań przeprowadzonych nad NR w warunkach stresu solnego wpisują się w tematykę realizowaną od wielu lat w ZFMR nad mechanizmami uruchamianymi przez rośliny w warunkach stresów abiotycznych. Wcześniejsze badania prowadzone w ZFMR pokazały, że istotnym elementem systemu adaptacyjnego do stresu jest plazmolemowa pompa protonowa, H<sup>+</sup>-ATPaza (Kłobus, Janicka Russak 2004, Janicka-Russak, Kłobus 2007). Białko to katalizuje jednokierunkowy transport protonów z cytoplazmy do apoplastu przy udziale energii pochodzącej z hydrolizy ATP, przez co odpowiedzialne jest za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej, który w warunkach stresu solnego może być wykorzystany przez roślinę między innymi do usuwania przez wtórne transportery toksycznego nadmiaru jonów poza obszar komórki (Kabała i Janicka-Russak 2012). Zauważono także, że w rozwijaniu tolerancji roślin na zasolenie ważną rolę jako cząsteczka sygnałowa odgrywa tlenek azotu (Zhao i wsp. 2004, Zhao i wsp. 2007). Jest to niewielka, wolnorodnikowa molekula o wysokiej reaktywności, która u roślin zaangażowana jest w regulację wielu procesów metabolicznych i rozwojowych np. kiełkowanie, rozwój korzeni, wzrost łagiewki pyłkowej, organogenezę, ale także procesy starzenia, czy zamykanie aparatów szparkowych (Mur i wsp. 2013). W badaniach prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin, w ramach projektu badawczego NCN OPUS No. 2012/05/B/NZ3/00422 kierowanego przez dr hab. Małgorzatę Janicką prof. UW., w których brałam udział jako wykonawca wykazano, że NO zwiększa aktywność plazmolemowej H<sup>+</sup>-ATPazy w korzeniach ogórków narażonych na działanie stresu solnego (Janicka i wsp. 2018). Otrzymane przez nas wyniki pokazały, że traktowanie roślin solą prowadzi do zwiększenia poziomu NO w korzeniach, dlatego dalsze badania, w których brałam udział, miały

na celu ustalenie źródeł powstającego NO. Pomimo licznych i zakrojonych na szeroką skalę badań nad biosyntezą tlenku azotu u roślin opisanych w literaturze proces ten nie został do końca wyjaśniony. Spośród wielu proponowanych enzymów odpowiedzialnych za produkcję NO, jednym z najczęściej wskazywanych u roślin jest reduktaza azotanowa (Aister i wsp. 2018). W badaniach ostatnich lat wykazano, że NR oprócz reakcji przekazywania  $e^-$  z NAD(P)H na azotan i redukcji tego jonu do azotynu, może także w określonych warunkach katalizować jednoelektronową redukcję azotynu do NO. Zdolność NR do redukcji azotynów do NO potwierdzono *in vitro* oraz *in vivo* (Yamasaki i wsp. 2000, Rockel i wsp. 2002), a także przy wykorzystaniu mutantów *nia1* i *nia2 Arabidopsis* (Desikan i wsp. 2002, Kolbert i wsp. 2010).

Ponieważ wcześniej pokazałam, że aktywność NR w korzeniach ogórków traktowanych solą wzrasta, postanowiłam sprawdzić, czy obserwowany wzrost aktywności jest skorelowany ze zwiększonym poziomem NO w tkankach. Zaplanowałam eksperymenty wyjaśniające potencjalny udział reduktazy azotanowej w syntezie NO w stresie solnym dowodzące nowej funkcji enzymu, czyli udziału w inicjacji procesów adaptacyjnych do stresu. Wyniki tych badań złożyły się na artykuł oryginalny opublikowany w *Plant Science* (Reda M, Golicka A, Kabała K, Janicka M, 2018 *Involvement of NR and PM-NR in NO biosynthesis in cucumber plants subjected to salt stress, Plant Science 267: 55-64*), będący częścią prezentowanego osiągnięcia naukowego. Doświadczenia przeprowadziłam wspólnie ze współautorkami na korzeniach ogórków traktowanych krótkim (1 dzień) i długim (6 dni) stresem solnym wywołanym przez 50 mM NaCl. Zaobserwowałyśmy wyraźny wzrost aktywności aktualnej NR oraz wzrost poziomu aktywacji reduktazy azotanowej wskazujący na zwiększenie puli nieufosforylowanego białka enzymatycznego w korzeniach traktowanych solą. Wynik ten potwierdziłam analizami Western blot z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko fosfoserynie oraz przeciwko białkom 14-3-3. Wysoka aktywność reduktazy azotanowej w korzeniach roślin traktowanych solą skorelowana była ze zwiększonym poziomem tlenku azotu w korzeniach. Co więcej, wzrost ilości NO w korzeniach traktowanych NaCl niwelowany był w obecności wolframianu sodu, powszechnie używanego, niespecyficznego inhibitora NR, co potwierdzało udział enzymu w biosyntezie NO w korzeniach podczas stresu solnego. Zaangażowanie i udział NR w generowaniu w korzeniach NO pod wpływem zastosowanego stresu solnego potwierdzają sprzyjające tej reakcji warunki panujące w tkankach, czyli zwiększenie stosunku jonów  $NO_2^-$  do jonów  $NO_3^-$  oraz spadek aktywności reduktazy azotynowej (NiR) przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej aktywności NR, co pokazałam w powyższej pracy.

Ważnym osiągnięciem tej pracy jest wykazanie, że podczas stresu solnego w korzeniach ogórków zmienia się także aktywność reduktazy azotanowej związanej z plazmolewą (PM-NR). Obecność tej formy NR w komórkach korzeni ogórka wykazały wcześniej badania prof. Grażyny

Kłobus, wieloletniego kierownika Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin (Kłobus i wsp. 1994, Kłobus 1995). Podobnie jak cytoplazmatyczna forma NR, PM-NR katalizuje redukcję  $\text{NO}_3^-$  do  $\text{NO}_2^-$ , jednak udział białka w asymilacji azotanów, z uwagi na niską w porównaniu z formą cytoplazmatyczną aktywność enzymu, nie jest istotny. Od wielu lat sugeruje się natomiast, że PM-NR razem z plazmolemową reduktazą azotyn-tlenek azotu (Ni-NOR) uczestniczy w syntezie NO w apoplacie poprzez dostarczanie azotynów dla Ni-NOR (Stöhr i Ullrich 2002, Stöhr i Stremlau 2006, Eick i Stöhr 2012). Wspólnie ze współautorami pracy wykazaliśmy, że wzrostowi poziomu NO w tkankach korzeni traktowanych NaCl towarzyszył wyraźny wzrost aktywności PM-NR, oznaczonej w oczyszczonych preparatach plazmolemy izolowanych, co sugeruje udział także tej formy NR, w zwiększaniu produkcji NO w korzeniach podczas stresu solnego. Podsumowując, reduktaza azotanowa, zarówno forma cytoplazmatyczna jak i związana z plazmolemą, poprzez udział w produkcji NO jest zaangażowana w mechanizmach adaptacyjnych uruchamianych u roślin w odpowiedzi na zasolenie.

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcia badań prezentowanych w ramach cyklu habilitacyjnego uważam:

1. Udowodnienie, że metabolity węglowe takie jak sacharoza, glukoza i  $\alpha$ -ketoglutaran, regulują aktywność NR głównie poprzez potranslacyjne modyfikacje białka polegające na defosforylacji NR i zwiększeniu puli aktywnej, nieufosforylowanej formy enzymu w tkance.
2. Wykazanie, że w przekazywaniu sygnału cukrowego, który prowadzi do zwiększenia aktywności NR w korzeniach roślin w odpowiedzi na metabolity węglowe istotne znaczenie ma odpowiedni poziom fosforanów heksoz związany z aktywnością enzymatyczną heksokinazy.
3. Pokazanie, że transdukcja sygnału cukrowego prowadzącego do wzrostu aktywności NR nie angażuje ścieżki związanej z sygnałami percepowanymi przez heksokinazę 1.
4. Wyjaśnienie, że stymulacja aktywności reduktazy azotanowej w roślinach poddanych działaniu stresu solnego jest przede wszystkim wynikiem defosforylacji białka NR przez fosfatazy białkowe.
5. Wykazanie, że w warunkach stresu solnego wzrost aktywności reduktazy azotanowej odpowiada za syntezę tlenku azotu w korzeniach, a w procesie tym uczestniczy zarówno NR cytoplazmatyczna, jak i NR związana z plazmolemą.

Nowy aspekt badań nad reduktazą azotanową, związany z udziałem tego enzymu w generowaniu NO jako ważnej cząsteczki sygnałnej, poszerza zakres mojej tematyki badawczej, którym mam zamiar się zająć w najbliższej przyszłości. Chciałabym sprawdzić, czy i w jaki sposób

potwierdzona już wzajemna zależność pomiędzy cząsteczkami sygnałnymi takimi jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO i H<sub>2</sub>S podczas transdukcji sygnału w warunkach stresów abiotycznych i w uruchamianiu reakcji obronnej rośliny, angażuje reduktazę azotanową jako potencjalne źródło NO. Pomimo potwierdzonych obserwacji o bezpośrednim udziale NR w produkcji NO w literaturze pojawiają się głosy sceptyczne, które sugerują, że możliwość bezpośredniego katalizowania redukcji NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do NO przez NR jest mało prawdopodobna w warunkach istniejących w tkance roślinnej (Chamizo-Ampudia i wsp. 2016). Sceptycy motywują to charakterystycznym dla białka NR wysokim powinowactwem do azotanu i o wiele niższym dla azotynu (Rockel i wsp. 2002). W badaniach prowadzonych na *Chlamydomonas reinhardtii* zaproponowano funkcjonowanie dwukomponentowego modelu produkcji NO, w którym NR zaangażowana jest jako białko generujące azotyn, substrat wykorzystywany do produkcji NO przez inne białko, katalizujące jego redukcję do NO i będące w bezpośrednim związku z NR. Wykazano, że białko to jest homologiczne do komponentu redukującego amidoksym (ARC) zidentyfikowanego także u człowieka (Chamizo-Ampudia i wsp. 2016). W związku z tymi doniesieniami chciałabym sprawdzić istnienie takiego systemu także u ogórka. Wykonana przez mnie wstępna analiza bioinformatyczna wykazała istnienie homologicznego genu w genomie ogórka. Obecnie przygotowuję koncepcję projektu badawczego dotyczącego tego zagadnienia.

#### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Poniżej przedstawiam wykaz innych opublikowanych prac naukowych niewchodzących w skład opisanego wcześniej osiągnięcia naukowego:

1. Jerzykiewicz J, Konieczna M, Kłobus G, Buczek J, 1999 Nitrate reductase inactivator from *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. *Acta Physiologiae Plantarum* 21(4): 433-441 [IF<sub>1999</sub>: 0.56, MNiSW: 25pkt]  
*Mój wkład w powstaniu tej pracy obejmuje wykonanie części doświadczeń (oznaczenie aktywności NR w obecności inhibitorów proteaz i ochraniaczy) i opracowanie tych wyników. Mój udział szacuję na 20%.*
2. Reda M, Kłobus G, Buczek J, 2000 Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej. *Postępy Biochemii* 46(1): 99-106 [MNiSW: 8pkt (lista B)]  
*Mój wkład w powstaniu tej pracy obejmuje współudział w przygotowaniu koncepcji i napisanie manuskryptu. Jestem też autorem korespondencyjnym pracy. Mój udział szacuję na 80%.*
3. Reda M, Kłobus G, 2006 Modifications of the activity of nitrate reductase from cucumber roots. *Biologia Plantarum* 50(1): 42-47 [IF<sub>2006</sub>: 1.198, MNiSW: 25pkt]

*Mój wkład w powstaniu tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji oraz zaplanowaniu doświadczeń, wykonanie wszystkich doświadczeń, współudział w interpretacji i dyskusji wyników oraz napisanie manuskryptu. Jestem też autorem korespondencyjnym pracy. Mój udział oceniam na 80%.*

4. Reda M, Kłobus G, 2008 Effect of different oxygen availability on the nitrate reductase activity in *Cucumis sativus* L. roots. *Biologia Plantarum* 52(4): 674-680 [IF<sub>2008</sub>: 1.426, MNiSW: 25pkt]

*Mój wkład w powstaniu tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji oraz zaplanowaniu doświadczeń, wykonanie wszystkich doświadczeń, współudział w interpretacji i dyskusji wyników oraz napisanie manuskryptu. Jestem też autorem korespondencyjnym pracy. Mój udział oceniam na 80%.*

5. Kabała K, Janicka-Russak M, Reda M, Migocka M, 2014 Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in *Cucumis sativus* under heavy metal stress. *Physiologia Plantarum*, 150: 32-45 [IF<sub>2014</sub>: 3.138, MNiSW: 40pkt]

*Mój wkład w powstaniu tej pracy obejmuje zaplanowanie oraz wykonanie analizy ekspresji genów wybranych podjednostek V-ATPazy i PPazy metodą real time PCR. Mój udział oceniam na 10%*

6. Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabała K, Migocka M, Reda M, 2015 Modification of plasma membrane NADPH Oxidase activity in cucumber seedlings roots in response to cadmium stress, *Plant Science* 234: 50-59 [IF<sub>2015</sub>: 3.362, MNiSW: 35pkt]

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji oraz interpretacji i dyskusji wyników. Mój udział oceniam na 5%.*

7. Janicka M, Reda M, Czyżewska K, Kabała K, 2018 Involvement of signaling molecules NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in modification of plasma membrane proton pump in cucumber roots subjected to salt or low temperature stress. *Functional Plant Biology* 45(4): 428-439 [IF<sub>2017</sub>: 2.121, MNiSW: 35pkt]

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji oraz zaplanowanie i wykonanie oznaczeń poziomu NO w tkankach i opracowanie i interpretacja tych wyników. Mój udział oceniam na 30%.*

8. Kabała K, Zboińska M, Głowiak D, Reda M, Jakubowska D, Janicka M, 2019 Interaction between the signaling molecules hydrogen sulfide and hydrogen peroxide and their role in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase regulation in cadmium-stressed cucumber roots. *Physiologia Plantarum* doi:10.1111/ppl.12819 [IF<sub>2017-2018</sub>: 2,58, MNiSW: 40 pkt]

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w wykonaniu oznaczeń ekspresji metodą real time PCR. Mój udział szacuję na 5%.*

9. Janicka M, Reda M, Napieraj N, Kabała K, Plant Abiotic Stress: Function of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In „Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants” Springer (March 2019), ed. Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ, rozdział w monografii, zaakceptowany do druku,

*Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji pracy oraz napisanie części dotyczącej funkcji NO u roślin podczas stresów abiotycznych. Mój udział oceniam na 40%.*

Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych publikacji wynosi: **14,385**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 26 stycznia 2017r) dla wyżej wymienionych publikacji wynosi: **233**

Mechanizmy regulujące asymilację azotu nieorganicznego przez rośliny, a zwłaszcza regulacja aktywności reduktazy azotanowej, budzą duże zainteresowanie w świecie naukowym. Od lat są one także przedmiotem badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin, w którym realizowałam pracę magisterską, a później kontynuowałam swoją pracę naukową w ramach studiów doktoranckich i jako pracownik naukowo-dydaktyczny na stanowisku asystenta i później adiunkta. W ramach pracy magisterskiej, którą wykonałam pod kierunkiem Pani dr Jolanty Jerzykiewicz, przeprowadziłam szereg doświadczeń mających na celu charakterystykę czynnika inaktywującego NR u *Spirodela polyrhiza*. Wyniki otrzymane w ramach pracy magisterskiej pokazały, że jest to enzym proteolityczny o charakterze proteazy serynowej. Wyniki tych badań stanowią część artykułu „Nitrate reductase inactivator from *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden” opublikowanego w *Acta Physiologiae Plantarum* (Jerzykiewicz i in., 1999 *Acta Physiol. Plant.* 21(4): 433-441), którego jestem współautorem.

W czasie studiów doktoranckich kontynuowałam badania nad regulacją aktywności reduktazy azotanowej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Grażyny Kłobus. Zajmowałam się wówczas przede wszystkim mechanizmami potranslacyjnymi regulacji aktywności tego enzymu w różnych warunkach środowiskowych. Mimo że zdecydowana większość azotu nieorganicznego asymilowana jest w częściach zielonych roślin, wiele danych literaturowych pokazało, że NR wykazuje wysoką aktywność także w korzeniach (Rufty i in. 1986, Oji i in. 1989). Niewiele jednak prac dotyczyło mechanizmów regulacji tego enzymu w tkankach niezielonych. Dlatego w swojej pracy doktorskiej skupiłam się głównie na badaniu tych modyfikacji w korzeniach, a rośliną modelową moich doświadczeń stał się ogórek *Cucumis sativus* L. Już po doktoracie poszerzyłam badania o dodatkowe analizy i opublikowałam z tej tematyki dwie prace: 1) Modifications of the activity of nitrate reductase from cucumber roots (Reda, Kłobus 2006 *Biologia Plantarum* 50(1): 42-47) i 2) Effect of different oxygen availability on the nitrate reductase activity in *Cucumis sativus* L. roots (Reda, Kobus 2008 *Biologia Plantarum* 52(4): 674-680). W pierwszej pracy udokumentowano, że reduktaza azotanowa izolowana z tkanek korzeni podlega potranslacyjnym, szybkim i odwracalnym modyfikacjom. Mechanizm tych modyfikacji jest podobny do dobrze opisanego dla tkanek zielonych (Kaiser i Spill 1991, Kaiser i Huber 2001). W pracy wykazałam, że

aktywność NR w ekstraktach izolowanych z korzeni siewek ogórka znacznie spadała po wprowadzeniu ATP i jonów  $Mg^{2+}$  do środowiska reakcji, a usunięcie  $Mg^{2+}$  oraz wprowadzenie AMP przywracało początkowy wysoki poziom aktywności tego enzymu *in vitro*. Obserwowane zmiany aktywności NR związane były z odwracalną fosforylacją, co potwierdziłam w doświadczeniach z użyciem staurosporyny (specyficznego inhibitora kinaz serynowo-treoninowych) oraz mikrocystyny LR (inhibitora fosfataz białkowych typu PP2A). Obecność staurosporyny znosiła hamujące działanie ATP na aktywność NR, z kolei mikrocystyna LR przeciwdziałała reaktywacji NR po wprowadzeniu AMP. Ponadto w pracy zademonstrowałam, że niższe pH środowiska reakcji (6.0) sprzyja obniżeniu aktywności NR *in vitro* w obecności ATP nawet przy braku jonów magnezu. Tym samym udowodniłam, że niższe pH może zastępować jony magnezu w inaktywacji ufosforylowanej formy NR, co nie było wcześniej obserwowane. W drugiej pracy badałam aktywność reduktazy azotanowej w korzeniach ogórka inkubowanych w warunkach różnej dostępności tlenu w środowiska. Wyniki pokazały, że niedobór tlenu powoduje wzrost aktywności NR widoczny już po 30 min szczególnie w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Równocześnie zwiększone natlenienie środowiska korzeni prowadzi do zmniejszenia aktywności tego enzymu. Indukowany wysokim natlenieniem środowiska spadek aktywności NR w korzeniach był niwelowany w obecności staurosporyny, co wskazuje na udział kinaz w tym procesie. Obserwowany spadek aktywności był odwracalny po zmniejszeniu poziomu natlenienia środowiska. Reaktywacja NR była wrażliwa na mikrocystynę LR co potwierdziło udział fosfataz w tym procesie. Wyniki te pokazały, że aktywność NR w korzeniach podobnie jak NR w tkankach zielonych podlega posttranslacyjnej regulacji polegającej na odwracalnych modyfikacjach białka enzymatycznego związanych z fosforylacją/defosforylacją i uruchamianych w odpowiedzi na określone czynniki środowiskowe inne niż w przypadku tkanek zielonych.

Poza moją główną tematyką badawczą dotyczącą reduktazy azotanowej mam w dorobku inne opublikowane prace będące efektem mojego udziału w różnych badaniach prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin. Wśród nich są artykuły dotyczące mechanizmów obronnych uruchamianych u roślin podczas stresów abiotycznych, w tym udziału pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu w tych mechanizmach oraz funkcji cząsteczek sygnałnych takich jak tlenek azotu, nadtlenek wodoru czy siarkowodór podczas niektórych stresów abiotycznych np. stresu solnego, niskiej temperatury czy metali ciężkich.

Praca: Kabala K, Janicka-Russak M, Reda M, Migocka M, 2014 Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in *Cucumis sativus* under heavy metal stress. *Physiologia Plantarum*, 150: 32-45 dotyczyła identyfikacji genów kodujących pompy protonowe zlokalizowane w błonie wakuolarniej (tonoplaście). Są to wakuolarna  $H^+$ -ATPaza (V-ATPaza) oraz



wakuolarna  $H^+$ -pirofosfataza (V-PPaza). Pompy te odpowiadają za aktywny transport protonów do wakuoli prowadząc do wytworzenia gradientu elektrochemicznego w poprzek tonoplastu, który może być wykorzystywany przez rośliny do transportu różnego rodzaju jonów do wakuoli np. usuwania nadmiaru jonów sodu czy metali ciężkich. Wcześniejsze badania wykonane przez dr hab. Katarzynę Kabałę prof. UW. wykazały, że w obecności metali ciężkich takich jak miedź czy kadm zmieniała się aktywność tonoplastowych pomp protonowych. Aktywność V-ATPazy, mierzona jako intensywność hydrolizy ATP oraz jako transport protonów przez błonę, rosła w obecności Cu, a zmniejszała się na skutek działania Cd. Zmniejszał się także transport protonów generowany przez V-PPazę (Kabała i wsp. 2010). Dlatego do dalszych badań, zaproponowanych i zainicjowanych przez dr Kabałę, wybrano podjednostkę c z sektora  $V_0$  V-ATPazy, dla której zidentyfikowano 3 geny w genomie ogórka oraz V-PPazę typu I, kodowaną przez 2 izogeny. W ramach tych badań, przy użyciu metody real time PCR oznaczyłam ekspresję genów *CsVHA-c1* - *CsVHA-c3* kodujących podjednostki c V-ATPazy oraz *CsVHPI.1* i *CsVHPI.2*, kodujących V-PPazę, w korzeniach ogórków potraktowanych 10 i 100  $\mu$ M stężeniami kadmu i miedzi, ale także niklu i cynku. Wyniki pokazały, że poszczególne izoformy są odmiennie regulowane przez metale ciężkie na poziomie transkrypcji genów. Stwierdzono wzrost ilości transkryptu *CsVHA-c1* i *CsVHA-c2* oraz *CsVHPI.1* w korzeniach pod wpływem Cu. Większa ekspresja tych genów może odpowiadać za obserwowaną wcześniej stymulację aktywności obu enzymów w obecności Cu, co pokazuje, że białka kodowane przez te geny stanowią istotny element mechanizmów zaangażowanych w adaptację siewek ogórka do stresu związanego z obecnością jonów miedzi w środowisku.

Kolejne badania, w których uczestniczyłam również dotyczyły reakcji roślin na stres wywołany obecnością metali ciężkich, a dokładnie regulacji aktywności roślinnej oksydazy NADPH zlokalizowanej w plazmolemie pod wpływem kadmu. Plazmolemowa oksydaza NADPH (Rboh) katalizuje redukcję tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) wykorzystując NADPH jako donor elektronów (Glyan'ko, Ischenko 2010). Anionorodnik ponadtlenkowy jest reaktywną formą tlenu o niskiej stabilności i podlega szybkiej dysmutacji do nadtlenu wodoru przez dysmutazę ponadtlenkową. Plazmolemowa NADPH oksydaza uważana jest za enzym pełniący kluczową rolę w generowaniu ROS u roślin (Suzuki i wsp. 2011). Ponadto wiadomo, że oksydaza plazmolemowa wpływa na ustalenie potencjału oksydoredukcyjnego błony, przez co korzystnie oddziałuje na aktywność plazmolemowej  $H^+$ -ATPazy, która jak wcześniej zaobserwowano, wzrasta w stresie kadmu (Janicka-Russak i wsp. 2012). Co więcej ustalono, że ekspresja genów kodujących PM  $H^+$ ATPazę może być modyfikowana przez  $H_2O_2$  (Janicka-Russak, Kabała 2012). W związku z tym podjęto badania zmierzające do określenia roli oksydazy NADPH w modyfikacjach pompy protonowej wywołanych obecnością kadmu. Mój wkład w prezentowane badania polegał na

identyfikacji i charakterystyce genów *CsRboh* kodujących plazmolemową oksydazę w genomie ogórka, w oparciu o sekwencje genów *Rboh* u *Arabidopsis*. Zidentyfikowano 9 genów *CsRboh*, a ekspresja kilku izoform (*CsRbohF1*, *CsRbohF2*, *CsRbohF3* i *CsRbohJ*) zwiększała się w korzeniach podczas traktowania roślin kadmem. U tych roślin obserwowano również wzrost aktywności oksydazy. Dodatkowo pokazano, że aktywność enzymów zaangażowanych w komórcie w produkcję NADPH (substrat dla aktywności oksydazy NADPH) także rośnie w korzeniach w warunkach zwiększonej obecności Cd w środowisku. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na udział oksydazy NADPH w adaptacji roślin do stresu kadmu poprzez możliwe oddziaływanie na aktywność PM H<sup>+</sup>ATPazy. Otrzymane wyniki złożyły się na pracę opublikowaną w *Plant Science* (Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabała K, Migocka M, Reda M, 2015 Modification of plasma membranę NADPH oxidase activity in cucumber seedlings roots in response to cadmium stress, *Plant Science* 234: 50-59).

Badania mechanizmów uruchamianych u roślin w trakcie różnych stresów abiotycznych (solnego, niskiej i wysokiej temperatury czy metali ciężkich) pokazały, że ogromną rolę pełni w nich plazmolemowa H<sup>+</sup>-ATPaza. Aktywność tego białka jest regulowana przez różne czynniki, między innymi przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który jest jedną z reaktywnych form tlenu generowanych w komórkach podczas warunków stresowych. Spora liczba doniesień sugeruje, że podwyższeniu poziomu ROS w komórkach może towarzyszyć wzrost poziomu innych cząsteczek sygnałowych takich jak tlenek azotu i/lub siarkowodór (H<sub>2</sub>S). Niewiele jednak wiadomo na temat wzajemnych zależności i powiązań między tymi cząsteczkami w roślinach rosnących w warunkach stresowych, a każda interakcja między molekułami sygnałowymi, czyli tzw. „cross-talk” może być bardzo złożona. Dlatego zaproponowaliśmy kompleksowe badania, obejmujące określenie zmian poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO i H<sub>2</sub>S w tkankach pod wpływem wybranych stresów (zasolenie, niska temperatura i metale ciężkie), zbadanie ich roli w kształtowaniu odpowiedzi rośliny na stres poprzez manipulacje ich endogenną zawartością, a także sprawdzenie ich udziału w regulacji ekspresji genów oraz modyfikacjach potranslacyjnych białek zaangażowanych w reakcjach obronnych rośliny uruchamianych podczas stresu. Zaplanowane badania uzyskały finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego OPUS No. 2012/05/B/NZ3/00422, kierowanego przez Panią dr hab. prof. UW. Małgorzatę Janicką. Aby sprawdzić współdziałanie tych trzech cząsteczek sygnałowych w stresie solnym i stresie chłodu siewki ogórka potraktowaliśmy NaCl (50mM) lub niską temperaturą (10°C). Mój udział w tych badaniach polegał na wykonaniu oznaczeń poziomu NO metodą fluorescencyjną w korzeniach ogórków stresowanych i postresowych oraz oznaczeniu ekspresji genów *CsHA* kodujących plazmolemową H<sup>+</sup>-ATPazę metodą real time PCR. Wyniki pomiarów ekspresji genów *CsHA* w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz generatorów cząstek NO i H<sub>2</sub>S (SNP i NaHS) pokazały różnice w działaniu tych cząstek na H<sup>+</sup>ATPazę. H<sub>2</sub>S sprzyja aktywacji ATPazy w

korzeniach w krótkim stresie solnym i podczas niskiej temperatury poprzez stymulację ekspresji aż 5 z 8 izoform genów *CsHA* ekspresjonowanych w korzeniach. NO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odgrywają mniejszą rolę w regulacji aktywności ATPazy. Zwiększenie ich poziomu w tkankach prowadziło do wzrostu transkryptu tylko izoformy *CsHA1*, która charakteryzuje się najniższą ekspresją spośród 8 przebadanych izoform. Analiza Western blot z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko fosfoserynie oraz białkom 14-3-3 pokazała, że NO bierze udział w potranslacyjnych modyfikacjach ATPazy związanych z fosforylacją. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowaliśmy w artykule oryginalnym Janicka M, Reda M, Czyżewska K, Kabała K, 2018 Involvement of signaling molecules NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in modification of plasma membrane proton pump in cucumber roots subjected to salt or low temperature stress (Function Plant Biol 45(4): 428-439).

Kolejną pracą, która powstała w ramach projektu OPUS No. 2012/05/B/NZ3/00422 jest artykuł: Kabała K, Zboińska M, Głowiak D, Reda M, Jakubowska D, Janicka M zatytułowany „Interaction between the signaling molecules hydrogen sulfide and hydrogen peroxide and their role in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase regulation in cadmium-stressed cucumber roots”. (Physiol Plant (2019) doi:10.1111/pp1.12819). Jak wiadomo, oprócz plazmolemowej H<sup>+</sup>-ATPazy w reakcjach obronnych na stesy abiotyczne, a zwłaszcza wywołanych obecnością metali ciężkich zaangażowane są też pompy protonowe zlokalizowane a tonoplście. Prowadzone wcześniej badania przed dr hab. prof. Katarzynę Kabałę pokazały, że aktywność wakuolarniej V-ATPazy zmienia się w korzeniach roślin potraktowanych metalami ciężkimi takimi jak: Cd, Cu, Ni czy Zn (Kabała i wsp. 2014). Ciekawym było więc sprawdzenie, czy w zmiany te mogą być zaangażowane cząsteczki sygnałne. Na początek podjęliśmy próbę zbadania wzajemnych zależności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>S w kontrolowaniu aktywności V-ATPazy w obecności wysokiego stężenia kadmu w środowisku. Wyniki pokazały, że aktywność V-ATPazy w korzeniach ogórków zależy od H<sub>2</sub>S i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ale cząsteczki te działają w przeciwny sposób. H<sub>2</sub>S prowadzi do stymulacji V-ATPazy, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do obniżenia poziomu aktywności tego enzymu. Stwierdziliśmy, że zmiany aktywności V-ATPazy indukowane przez oba przekaźniki nie są związane z regulacją ekspresji genów *VHA-a* i *VHA-c*, co sugeruje, że H<sub>2</sub>S i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wpływają na pompę protonową na poziomie potranslacyjnym np. za pośrednictwem dobrze znanego mechanizmu obejmującego regulacyjne tworzenie mostków dwusiarczkowych. Mój wkład w prowadzone badania polegał na oznaczaniu ekspresji genów *CsRboh* kodujących plazmolemową oksydazę NADPH w korzeniach traktowanych kadmem i traktowanych generatorem H<sub>2</sub>S. Analiza poziomu aktywności oksydazy NADPH, która była mocno stymulowana w obecności H<sub>2</sub>S oraz analiza ekspresji genów *CsRboh* pokazała, że białko to uczestniczy w transdukcji sygnału indukowanego przez kadm obecny w środowisku oraz przez H<sub>2</sub>S prowadząc do zwiększonej produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Z drugiej strony, podwyższona ilość H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może przyczyniać się do podniesienia

poziomu endogennego H<sub>2</sub>S, co wykazały wyniki pomiaru aktywności desulfhidazy odpowiedzialnej za wytwarzanie H<sub>2</sub>S w komórkach. Powyższe wyniki pokazują też, że istnieją wzajemne zależności pomiędzy H<sub>2</sub>S i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podczas przekazywania sygnału i generowania odpowiedzi w korzeniach ogórka narażonych na działanie kadmu w środowisku.

Oprócz opisanych artykułów oryginalnych w moim dorobku są również dwie prace przeglądowe. Pierwsza, napisana w języku polskim, dotyczy budowy i funkcji reduktazy azotanowej oraz sposobów jej regulacji w odniesieniu do tkanek zielonych (Reda M, Kłobus G, Buczek J, 2000 Budowa i sposoby regulacji reduktazy azotanowej. Postępy Biochemii 46(1): 99-106). Druga to zaakceptowany do druku rozdział w monografii wydawnictwa Springer zatytułowana „Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants pod redakcją Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ. Przygotowana we współautorstwie praca stanowi przegląd aktualnej literatury dotyczącej funkcji tlenu azotu i nadtlenu wodoru oraz ich wzajemnych powiązań w adaptacji roślin do stresów abiotycznych (Janicka M, Reda M, Napieraj N, Kabała K, Plant Abiotic Stress: Function of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In „Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants” Springer (March 2019), ed. Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ).

#### Podsumowanie działalności naukowej:

Sumaryczny Impact Factor dla prac stanowiących osiągnięcie naukowe: **14,326**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 26 stycznia 2017r) dla prac stanowiących osiągnięcie naukowe: **145**

Sumaryczny Impact Factor dla pozostałych publikacji nieujętych w cyklu habilitacyjnym: **14,385**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 26 stycznia 2017r) dla pozostałych prac nie ujętych w cyklu habilitacyjnym– **233**

Sumaryczny Impact Factor dla wszystkich publikacji: **28,711**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje: **378**

Liczba cytowań wg Web of Science (All Databases): **68**, liczba cytowań bez autocytaowań: **58**

Indeks Hirscha wg Web of Science: **5**

#### Konferencje i recenzje

Wyniki badań, które prowadziłam i w których uczestniczyłam prezentowane były także w formie wystąpień plakatowych na różnych konferencjach i zjazdach naukowych o randze międzynarodowej i krajowej, takich jak: The Federation of European Societies of Plant Biology Congress (FESPB Congresses), Konferencje Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin (PSPEB Conferences), International Symposium of Inorganic Nitrogen Assimilation in

Plants, Conference “Ecophysiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors”, Plant Biology Congress, Plant Oxygen Group Conference, Oxidative Stress Conference, Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics (łącznie 18 prezentacji). Ponadto, podczas mojej pracy wykonałam szereg recenzji artykułów oryginalnych dla czasopism o randze międzynarodowej takich jak: Acta Physiologiae Plantarum, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Scientific Reports, Bioinformatics, Open Agriculture Journal, The Scientific Pages of Horticulture, Acta Scientiarum Polonorum Series Hortorum Cultus i innych (łącznie 41 recenzji).

#### Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

Działalność dydaktyczna stanowi znaczny element mojej aktywności zawodowej. Prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów rozpoczęłam już w czasie studiów doktoranckich i kontynuuję je od momentu zatrudnienia w 2002 r. jako asystent, a później adiunkt w Zakładzie Fizjologii Roślin (obecnie Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin). Zajęcia te mają charakter zarówno wykładów, jak i ćwiczeń laboratoryjnych oraz konwersatoriów i obejmują zarówno przedmiot kierunkowy, fizjologia roślin, jak i trzy autorskie przedmioty oferowane w ofercie przedmiotów fakultatywnych. Ponadto biorę udział w różnego rodzaju projektach dydaktycznych realizowanych na przez Wydział Nauk Biologicznych, jak i inne wydziały. Przygotowywałam materiały dydaktyczne do ćwiczeń oraz współprowadziłam wykład w języku angielskim realizowany na kierunku „Biotechnologia w języku angielskim” w ramach projektu „Akademia rozwoju kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki” UDA-POKL.04.03.00-00-242/12-00. Ostatnio opracowałam koncepcję programu i sylabus do autorskich przedmiotów (Farmaceutyczne aspekty biotechnologii” i „Metody transformacji genetycznej”) dla nowej specjalności „Biologia eksperymentalna i mikrobiologia” w ramach projektu „Zintegrowany Program Rozwoju Uniwersytetu Wrocławskiego 2018-2022” współfinansowany ze środków Unii Europejskiej (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój - PO WER).

Dotychczas byłam opiekunem 13 prac magisterskich i 5 prac licencjackich oraz wykonałam recenzje 6 prac licencjackich zrealizowanych przez studentów na kierunku biologia, specjalność biologia eksperymentalna oraz kierunku genetyka i biologia eksperymentalna. Sprawowałam też opiekę nad praktyką studencką nieobjętą programem studiów studenta III roku studiów I stopnia kierunku Biologia, specjalność Biologia eksperymentalna. Byłam także promotorem pomocniczym w pracy doktorskiej zatytułowanej „Biogeochemia azotu wysokogórskich zbiorowisk roślinnych Karkonoszy” zrealizowanej w Katedrze Ekologii, Biogeochemii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Biologicznych UWr. Ponadto regularnie prowadzę zajęcia dla szkół gimnazjalnych i ponadgimnazjalnych oferowanych przez Wydział Nauk Biologicznych UWr. oraz dla szkół objętych patronatem WNB. Prowadziłam także zajęcia w ramach kursu dokształcającego dla

nauczycieli „Problemy współczesnej biologii”. Ponadto, corocznie aktywnie uczestniczę w akcjach popularyzujących nauki biologiczne takich jak Noc Biologów, Dolnośląski Festiwal Nauki, prowadząc zajęcia laboratoryjne i autorskie pokazy.

W celu podnoszenia swoich kwalifikacji jako pracownika naukowo-dydaktycznego uczestniczyłam w różnego rodzaju szkoleniach i warsztatach organizowanych przez jednostki UWr i inne. Wzięłam udział między innymi w kilku warsztatach organizowane przez Centrum Kształcenia na Odległość UWr. przygotowujące do prowadzenia zajęć dydaktycznych w systemie e-learning (Digital storytelling w dydaktyce”, „Platforma Moodle w pracy dydaktycznej – poziom zaawansowany”, „Power Point dla zaawansowanych”), a także w szkoleniu w ramach projektu „DOBRA KADRA – podniesienie kompetencji kadry dydaktycznej Uniwersytetu Wrocławskiego na rzecz wzmocnienia jakości kształcenia na uczelni" POWR.03.04.00-00-D143/16 dotyczącym wykorzystania narzędzi MS Office 365 w dydaktyce.

#### Działalność organizacyjna

Oprócz aktywności naukowej i dydaktycznej od lat jestem mocno zaangażowana w działania organizacyjne na rzecz macierzystej jednostki oraz Wydziału i całego Uniwersytetu. Byłam członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na rok 2016/2017 na studia stacjonarne I stopnia na kierunku Genetyka i biologia eksperymentalna. Od 2012 roku pełnię funkcję Społecznego Inspektora Pracy w Instytucie Biologii Eksperymentalnej. Jest to już druga moja kadencja. W 2014 roku zostałam powołana przez Dziekana WNB jako osoba do sprawowania kontroli nad postępowaniem z substancjami zubożającymi warstwę ozonową i fluorowanymi gazami cieplarnianymi w Instytucie Biologii Eksperymentalnej. Od roku 2012 jestem członkiem Komisji do spraw bezpieczeństwa biologicznego dla kategorii II, III, IV zamkniętego użycia GMO na Uniwersytecie Wrocławskim. Aktywnie uczestniczyłam w przygotowywaniu wniosków o zamknięte użycie GMO w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin oraz utworzenie Zakładu Inżynierii Genetycznej w obrębie Instytutu Biologii Eksperymentalnej. Ostatnio biorę udział jako przedstawiciel WNB w pracach zespołu do spraw opracowania projektu zarządzenia dotyczącego postępowania z chemicznymi substancjami niebezpiecznymi i mieszaninami niebezpiecznymi (w tym prekursorami) w Uniwersytecie Wrocławskim.

Za działalność organizacyjną otrzymałam nagrody Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego (za rok 2013 i za rok 2016).

*Wykaz wszystkich moich publikacji, doniesień konferencyjnych oraz pozostałe działania składające się na moją aktywność naukową, dydaktyczną i organizacyjną przedstawiłam jako załącznik nr 4.*

## Literatura

- Abd el Baki GK, Siefritz F, Man HM, Welner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell Environ* 23: 515-521
- Astier J, Gross I, Druner J (2018) Nitric oxide production in plants: un update. *J Exp Bot* 69(14): 3401-3411
- Bourgeois-Chaillou P, Perez-Alfocea F, Guerrier G (1992) Comparative effects of N-Sources on growth and physiological responses of soyabean exposed to NaCl-stress. *J Exp Bot* 43:1225-1233
- Campbell WH (2001) Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase. *Cell Mol Life Sci* 58: 194-204.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Ocana-Calahorro F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galvan A, Fernandez E (2016) A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ* 39: 2097-2107
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E (2017) Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci.* 22 (2).
- Crawford NM, Arst Jr HN (1993) The molecular genetics of nitrate reductase assimilation in fungi and plants. *Annu Rev Genet* 27: 115-145
- Debouba M, Maâroufi-Dghimi H, Suzuki A, Ghorbel MH, Gouia H (2007) Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Ann Bot* 99: 1143-1151
- de Cires A, de la Torre A, Delgado B, Lara C (1993) Role of light and CO<sub>2</sub> fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves. *Planta* 190: 277-283
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci, USA* 99:16314–16318
- Eick M, Stöhr C (2012) Denitrification by plant roots? New aspects of plant plasma membrane-bound nitrate reductase. *Protoplasma* 249: 909-918
- Flores P, Botella MÁ, Cerdá A, Martínez V (2004) Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants under saline stress. *Can J Bot* 82: 207-213
- Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ Exp Bot* 47: 39-50
- Glyan'ko AK, Ischenko AA (2010) Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46: 463–471
- Gouia H, Ghorbal MH, Touraine B (1994) Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton, *Plant Physiol* 105: 1409-1418
- Granot D (2008) Putting plant hexokinases in their proper place. *Phytochem.* 69: 2649-2654
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG (1992) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 296(1): 58-65
- Janicka M, Reda M, Czyżewska K, Kabała K (2018) Involvement of signaling molecules NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in modification of plasma membrane proton pump in cucumber roots subjected to salt or low temperature stress. *Function Plant Biol* 45: 428-439

- Janicka-Russak M, Kabała K, Burzyński M (2012) Different effect of cadmium and copper on H<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. *J Exp Bot* 63: 4133–4142
- Janicka-Russak M, Kłobus G (2007) Modification of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in response to NaCl and ABA. *J Plant Physiol* 164: 295-302
- Kabała K, Janicka-Russak M, Kłobus G (2010) Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper. *J Plant Physiol* 167: 1328-1335
- Kabała K, Janicka-Russak M (2012) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from NaCl treated cucumber roots. *Biologia Plantarum* 56 (2): 377-382
- Kaiser WM, Huber SC (1994) Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol* 106: 817-821
- Kaiser WM, Huber SC (1997) Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR. *J Exp Bot* 48: 1367-1374
- Kaiser WM, Huber SC, 2001 Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52(363): 1981-1989
- Kaiser WM, Spill D, 1991 Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol* 96: 368-375
- Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai Ch-B, Rockel P, Sonoda M, Planchet E (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights an unusual case and potentially important side reaction. *J Exp Bot* 53(370): 875-882
- Karve R, Rauh BL, Xia X, Kandasamy M, Meagher RB, Sheen J, Moore B.d (2008) Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta* 228: 411-425
- Kłobus G (1995) The role of plasma membrane-bound activities in nitrate transport into sealed plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* L. roots. W: Balulska F., Ciamporova M., Gasparicova O., Barlow P.W. (red.) *Developments in Plant and Soil Science. Structure and Function of Roots*. 58 Kluwer Academic Publishers str.133-140
- Kłobus G, Marciniak J, Buczek J (1994) Comparative studies on the soluble and plasma membrane associated nitrate reductase from *Cucumis sativus* L. roots. *Acta Soc Bot Pol* 63(3-4): 309-314
- Kłobus G, Janicka-Russak M (2004) Modulation by cytosolic components of proton pump activities in *Cucumis sativus*, roots during salt stress. *Physiol Plant* 121: 84-92
- Kolbert Z, Ortega L, Erdei L. 2010. Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *Journal of Plant Physiology* 167, 77–80
- Krapp A (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* 25: 115-122
- Lillo C (1994) Light/dark regulation of higher plant nitrate reductase related to hysteresis and calcium/magnesium inhibition. *Physiol Plant* 91: 295-299
- Lillo C, Meyer Ch, Lea US, Provan F, Oltedal S (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase, *J Exp Bot* 55(401): 1275-1282
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141 – 1157
- Meyer C, Stitt M (2001) Nitrate reduction and signaling. In *Plant Nitrogen*. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF. Springer-Verlag; pp: 37-59



- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ (2007) Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J Exp Bot* 59(1): 111-119
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science* 300: 332-336
- Mur L, Mandon J, Persijn S i wsp. (2013) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, Volume 5
- Oji Y, Otani Y, Hosomi Y, Wakiuchi N, Shiga H, 1989 Nitrate reduction in root and shoot and exchange of reduced nitrogen between organs in two-row barley seedlings under light-dark cycles. *Planta* 179: 359-366
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* 53, 103–110
- Ruffy TW Jr., Thomas JF, Remmler JL, Campbell WH, Volku RJ 1986 Intracellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol* 82:675-680
- Sheen J, Zhou L, Jang JCh (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410-418
- Stöhr C, Strelau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* 57: 463–470
- Stöhr C, Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* 53: 2293-2303
- Suzuki N, Miller G, Marales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Cur Opin Plant Biol* 14:691–699
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate, *Plant Cell* 12: 1491-1510
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM (2003) Microarray Analysis of the nitrate responses in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron and sulfate metabolism, *Plant Physiol* 132: 556-567
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol Gen Genet* 239: 289-297
- Yamasaki H, Sakihama Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* 468, 89–92
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide function as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.* 134: 849-857
- Zhao MG, Tian QY, Zhang WH (2007) Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144: 206-217

Matgorata Redo